

09/571513 1-11-18  
12-18**Fluorescent compound suitable for use in the detection of saccharides**Patent Number:  US5503770

Publication date: 1996-04-02

Inventor(s): JAMES TONY (JP); SANDANAYAKE SAMAN (JP); SHINKAI SEIJI (JP)

Applicant(s):: JAPAN RES DEV CORP (JP)

Requested Patent:  DE4439783

Application Number: US19940336236 19941107

Priority Number(s): JP19930302385 19931107; JP19940147061 19940606

IPC Classification: C09K11/06 ; C07C211/33

EC Classification: C07F5/02C, C09K11/06Equivalents:  GB2284809

---

**Abstract**

Disclosed is a fluorescent compound of a molecular structure comprising a fluorophore, at least one phenylboronic acid moiety, and at least one amine-providing nitrogen atom where the nitrogen atom is disposed in the vicinity of the phenylboronic acid moiety so as to interact intermolecularly with the boronic acid. The compound emits fluorescence of a high intensity upon binding to saccharide(s), and is therefore suitable for use in the detection of saccharide(s).

Data supplied from the esp@cenet database - I2



(19) BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND  
  
DEUTSCHES  
PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift  
(10) DE 44 39 783 A 1

(51) Int. Cl. 6.  
C 07 F 5/02  
G 01 N 33/66  
// A61K 49/00, C07C  
211/31

(21) Aktenzeichen: P 44 39 783.6  
(22) Anmeldetag: 7. 11. 94  
(43) Offenlegungstag: 7. 5. 98

DE 44 39 783 A 1

<p>(30) Unionspriorität: 302385/93 07. 11. 93 JP 147061/94 06. 06. 94 JP</p> <p>(71) Anmelder: Research Development Corp. of Japan, Kawaguchi, Saitama, JP</p> <p>(74) Vertreter: Wagner, K., Dipl.-Ing.; Geyer, U., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 80538 München</p>	<p>(72) Erfinder: James, Tony, Kurume, Fukuoka, JP; Sandanayake, Saman, Kurume, Fukuoka, JP; Shinkai, Seiji, Fukuoka, JP</p>
---	--

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- (54) Fluoreszente Verbindung geeignet zur Verwendung bei der Detektion von Sacchariden
- (57) Eine Fluoreszenzverbindung mit einer Molekularstruktur, die ein Fluorophor aufweist, mindestens eine Phenylboronsäuregruppierung und mindestens ein aminvorstehendes Stickstoffatom, wobei das Stickstoffatom in der Nähe der Phenylboronsäuregruppierung angeordnet ist, um so in Wechselwirkung zu treten in intermolekularer Hinsicht mit der Boronsäure. Die Verbindung emittiert Fluoreszenz mit einer hohen Intensität bei der Bindung mit Sacchariden oder einem Saccharid und die Verbindung ist daher geeignet zur Verwendung bei der Detektion eines oder mehrerer Saccharide.

DE 44 39 783 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf eine neue fluoreszente Verbindung und insbesondere auf eine fluoreszente Verbindung, die geeignet ist zur Verwendung bei der Detektion von Sacchariden oder Zucker, wie beispielsweise Glukose und ferner auf die Detektion von Sacchariden mit einer solchen Fluoreszenzverbindung.

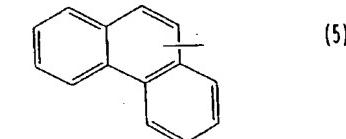
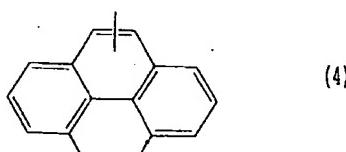
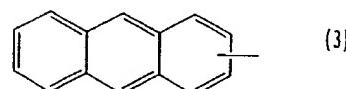
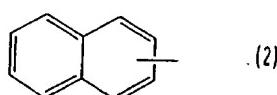
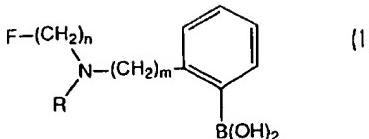
Stand der Technik. Saccharide oder Zucker sind organische Verbindungen, die für lebende Organismen unerlässlich sind, und die eine wichtige Rolle spielen bei der Informationsübertragung, bei dem Energiemetabolismus und bei Strukturbildung in solchen Organismen. Beispielsweise ist Glucose, insbesondere D-Glucose eine entscheidende Energiequelle für verschiedene Zellen beim Aufbau verschiedener Organe. Glucose wird in der Leber als Glykogen gespeichert und nach Bedarf für den Energieverbrauch in Körperflüssigkeiten freigegeben. Die Herstellung und der Verbrauch der Glucose sind in Körperflüssigkeiten eines normalen und gesunden Menschen wohl ausgereglicht, wobei die Glucosekonzentration in den Flüssigkeiten oder Fluids konstant gehalten wird. Auf diese Weise gestattet die Detektion oder Feststellung von Glucose im Blut oder im Urin wertvolle Information für die Diagnose von Krankheiten, wie beispielsweise Diabetes und einer Adrenalininsuffizienz.

Ein Glucosesensor unter Verwendung eines Enzyms ist die am besten bekannte praktische Maßnahme zur Detektion von Sacchariden. Dieses Verfahren umfaßt die Zersetzung der Glucose mit dem Enzym (Glucoseoxydate) und die Messung der Menge an Wasserstoffperoxid, welches durch die Zersetzung erzeugt wird, und zwar durch geeignete Mittel (wie beispielsweise eine Elektrode). Obwohl dieses Verfahren ein etabliertes Verfahren ist, wird das aus einem lebenden Körper kommende Enzym seine Qualität irreversibel mit der Zeit verändern und kann nicht für die wiederholte Verwendung "recycled" werden. Die Probe kann nicht für andere Meßzwecke verwendet werden, da die Glucose bereits zerlegt ist. Zudem richtet sich der konventionelle Sensor nur auf die Detektion von Zucker in einer "in vitro"-Probe, d. h. eine aus dem lebenden Körper entnommene Probe. Wenn es möglich wäre, Saccharide an Stellen innerhalb des lebenden Körpers zu detektieren, so könnte man vielmehr Information erhalten, die außerordentlich brauchbar wäre bei der Diagnose und der Behandlung von Krankheiten und der Entwicklung von Arzneimitteln. Der derzeitige Saccharidsensor ist jedoch weit weg von der Erfüllung solcher Erwartungen.

Zusammenfassung der Erfindung. Die vorliegende Erfindung sieht eine neue fluoreszente Verbindung vor, die unterschiedenen möglichen Verwendungen besonders geeignet ist, wie die Verwendung bei der Detektion von Sacchariden. Somit wird erfahrungsgemäß eine Verbindung vorgesehen, die in der Lage ist, Fluoreszenz zu emittieren, und zwar durch Kombination mit Sacchariden; die Verbindung hat eine Molekularstruktur, die folgendes aufweist: ein Fluorophor, mindestens eine Phenylboronsäure-Gruppierung und mindestens ein aminlieferndes Stickstoffatom, wobei das Stickstoffatom in der Nähe der Phenylboronsäure-Gruppierung angeordnet ist, um so intermolekular mit der Boronsäure in Wechselwirkung zu treten.

Eine typische Verbindung, die innerhalb einer derartigen Struktur liegt, kann erfahrungsgemäß ausgedrückt werden durch die folgende allgemeine Formel (1):

5 Die obigen Formel (1) repräsentiert F ein Fluorophor. Beispiele von Fluorophoren sind eine Anzahl von Atomgruppen oder funktionalen Gruppen, die -Elektronensysteme enthalten. Bevorzugte Fluorophore umfassen die folgenden: Naphtyl, Anthryl, Pyrenyl und Phenanthryl, die ausgedrückt werden können durch die folgenden Strukturformeln (2), (3), (4) und (5):



35 Die fluorophorbildenden Atom- oder Funktionsgruppen können substituierte sein, so lange die Substituenten oder der Substituent in nicht nachteiliger Weise die Fluoreszenz beeinflußt. Beispielsweise ist die Substitution mit einer oder mehreren Sulfonsäuregruppen bevorzugt, insbesondere dann, wenn die Verbindung in einem wäßrigen Strömungsmittel oder einem wäßrigen Fluid aufgelöst werden soll für die Detektion von Sacchariden, die darin enthalten sind, da dies der Verbindung die Eigenschaft der Wasserlöslichkeit 40 45 50 55 60 65 erteilt. Das am meisten bevorzugte Fluorophor wird durch Anthryl exemplifiziert.

In der Formel (1) bezeichnet R kombiniert mit dem Stickstoffatom, eine niedrigere aliphatische oder aromatische Funktionsgruppe. Im allgemeinen ist R eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, d. h. Methyl, Ethyl, Propyl oder Butyl oder eine Phenylgruppe.

In der Formel (1) ist n gleich 0, 1 oder 2. Somit ist das Stickstoffatom in der Verbindung der vorliegenden Erfindung in der Nähe der Boronsäuregruppierung angeordnet und das Stickstoffatom ist durch die Methylengruppe oder Ethylengruppe oder direkt kombiniert an der Ortho-Position der Phenylboronsäure. Vorzugsweise ist m gleich 1 und somit ist der Stickstoff mit der Phenylgruppe durch eine Methylengruppe kombiniert.

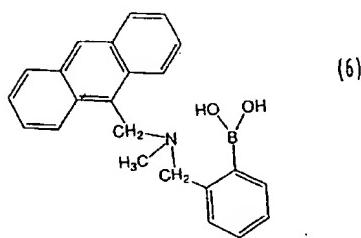
In der Formel (1) ist n also 0, 1 oder 2, wobei n + m eine ganze Zahl von 2 oder 3 ist. Somit ist das Stickstoffatom und die Boronsäure nicht so weit weg von dem Fluorophor posi-

tioniert. Vorzugsweise ist  $n$  gleich 1.

Die die Phenylboronsäure bildende Phenylgruppe kann durch einen geeigneten Substituenten oder durch geeignete Substituenten substituiert sein, so lange nur diese Substitution die Fluoreszenz nicht nachteilig beeinflußt. Beispiele von Substituenten sind Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Phenyl-, Methoxy-, Ethoxy-, Butoxy- und Phenoxygruppen.

Die durch die Formel (1) ausgedrückte erfundungsgemäße Verbindung enthält ein Fluorophor in seiner Molekularstruktur, aber emittiert keine Fluoreszenz bei Abwesenheit von Sacchariden. Das Verständnis geht dahin, daß dies daran liegt, weil die Fluoreszenz des Fluorophors unterdrückt wird durch das nicht-geteilte Elektronenpaar des Stickstoffatoms: das Elektron des Stickstoff besitzt den niedrigsten angeregten Singulett Energiezustand des Fluorophors, um so die Fluoreszenz zu unterdrücken. Die erfundungsgemäße Verbindung emittiert jedoch Fluoreszenz mit einer hohen Intensität bei der Bindung mit Sacchariden. Dieses Phänomen kann wie folgt erläutert werden: Das Vorhandensein von Sacchariden erzeugt eine Verbindung zwischen dem Stickstoffatom (N) und dem Boratom (B) zur Bildung eines starken Komplexes aus dem Saccharid mit der Phenylboronsäureverbindung der Erfindung, wobei das elektronendefizierte oder arme Boratom eine Bindung mit dem elektronenreichen Stickstoff hat. Somit wird das nicht-geteilte Elektronenpaar des Stickstoffatoms verwendet für die Bindung mit dem Boratom und trägt nicht bei zu dem Fluoreszenz unterdrückenden Elektrogentransferprozeß, wodurch die intrinsische Fluoreszenz der Verbindung ausgedrückt wird.

Eine typische Verbindung, die im Bereich der Formel (1) der Erfindung fällt, ist die folgende Verbindung mit der Formel (6), wobei F (das Fluorophor) Anthryl ist, R ist Methyl und jeder der Werte  $n$  und  $m$  ist 1:

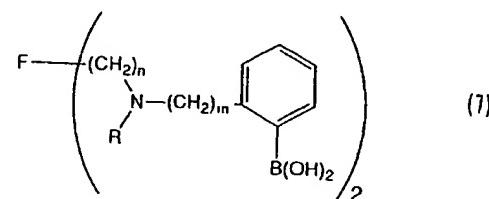


Diese Verbindung zeigt eine Fluoreszenzemission einer stark erhöhten Intensität in der Anwesenheit von Monosacchariden, wie beispielsweise D-Glucose und D-Fructose. Auf diese Weise ist die Verbindung geeignet zur Verwendung bei der Detektion von Monosacchariden im allgemeinen oder selbst einem speziellen Monosaccharid. Bei der Detektion eines speziellen Monosaccharids aus einer Probe, die viele Monosaccharide enthalten kann, wird die Probe im allgemeinen einer Vorbehandlung (beispielsweise einer Chromatographie) unterworfen, und zwar für die Trennung der Monosaccharide gefolgt von der Detektion mit der fluoreszenten Verbindung der vorliegenden Erfindung.

Die Detektion mit der fluoreszenten Verbindung der vorliegenden Erfindung wird ausgeführt durch Zugabe der Verbindung zu der Probe und durch ein photoskopisches Verfahren, wobei die erhöhte Intensität der Fluoreszenz bestimmt wird, und zwar infolge der Verbindung mit dem Saccharid. Alternativ kann die Detektion mit der erfundungsgemäßen fluoreszenten Verbindung durchgeführt werden durch ein chromatographisches Verfahren, wo die erfundungsgemäße Verbindung auf einem Trägmaterial getragen wird, durch welches die saccharidenthaltende Probe geleitet

wird zum Zwecke der Detektion, basierend auf der erhöhten Fluoreszenzintensität infolge des Komplexes der Verbindung und des Saccharids.

Gemäß dem erfundungsgemäßen Konzept kann auch eine Verbindung vorgesehen sein, die in selektiver Weise sich mit einem speziellen Saccharid verbindet, wodurch eine stark erhöhte Fluoreszenz vorgesehen wird. Insbesondere sieht die vorliegende Erfindung eine Fluoreszenzverbindung vor, die die folgende allgemeine Formel (7) besitzt:



In der oben angegebenen Formel bezeichnen  $n$  und  $m$  jeweils 0, 1 oder 2, wobei  $n + m$  2 oder 3 ist. F repräsentiert ein Fluorophor und R repräsentiert eine niedrigere aliphatische oder aromatische Funktionsgruppe.

Die Verbindung der Formel (7) ist gekennzeichnet durch ihre selektive Bindung mit Glucose, was eine starke Fluoreszenz zur Folge hat. Die Verbindung ist daher zur Verwendung bei der Detektion von Glucose geeignet.

In der Formel (7) bezeichnen  $n$  und  $m$  jeweils eine ganze Zahl, wobei  $n+m$  2 oder 3 sind. Jede der Größen  $n$  und  $m$  kann 0 sein; somit bezeichnen  $n$  und  $m$  jeweils 0, 1, 2 oder 3.

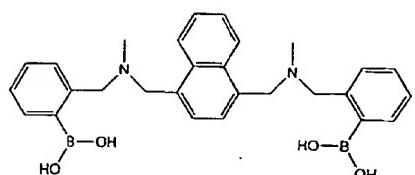
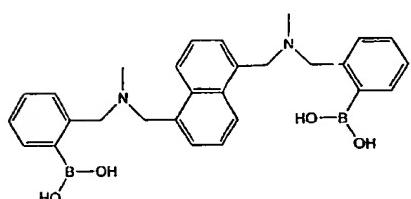
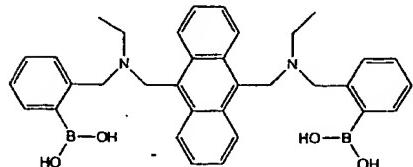
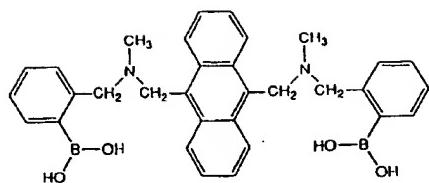
Vorzugsweise ist  $n + m$  2, wobei jeder der Werte  $n$  und  $m$  0, 1 oder 2 ist, wobei beide Werte  $n$  und  $m$  am bevorzugtesten 1 sind. Eine derartige spezifische Länge der Methylen( $\text{CH}_2$ )-Gruppe oder Gruppierung der erfundungsgemäßen Verbindung, ausgedrückt durch die Formel (7), sieht eine Molekularstruktur vor, die geeignet ist, um Glucose zu binden, und zwar durch zwei Boronsäuregruppen oder -gruppierungen der Verbindung.

In der Formel (7) werden die Fluorophore exemplifiziert durch eine Zahl der Atomgruppen oder funktionellen Gruppen, die  $n$ -Elektronensysteme enthalten. Als bevorzugte Fluorophore sind mitumfaßt die folgenden: Naphthyl, Anthryl, Pyrenyl und Phenanthryl, die ausgedrückt werden können durch die oben genannten Strukturformel (2) bzw. (3) bzw. (4) bzw. (5).

Die fluorophorbildenden Atom- oder Funktionsgruppen können substituierte Gruppen sein, so lange die Substituenten oder der Substituent nicht in nachteiliger Weise die Fluoreszenz beeinflussen oder beeinflussen. Beispielsweise ist die Substitution mit Sulfonsäuregruppen oder einer Sulfonsäuregruppe bevorzugt, da dies der Verbindung Wasserlöslichkeit gibt. Das am meisten bevorzugte Fluorophor ist durch Anthryl exemplifiziert.

In der Formel (7) bezeichnet R kombiniert mit dem Stickstoffatom eine niedrige aliphatische oder aromatische Funktionsgruppe. Im allgemeinen ist R eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, d. h. Methyl, Ethyl, Propyl oder Butyl oder eine Phenylgruppe.

Bevorzugte Verbindungen der Erfindung fallen in dem Bereich der Formel (7) und sind exemplifiziert durch die folgenden Verbindungen (8), (9), (10) und (11), von denen die Verbindung (8) besonders bevorzugt ist.



Überraschenderweise emittieren die erfindungsgemäßen Verbindungen typifiziert durch die Verbindung (8) eine starke Fluoreszenz insbesondere in Anwesenheit von Glucose in einer wäbrigen Lösung mit einer Konzentration entsprechend derjenigen, wie sie in den menschlichen Körperfluids (50–250 mg/l oder 0,0005 M–0,001 M) gefunden wird, und zwar mit einem pH-Wert, der der Neutralität oder nahe Neutralität entspricht. Eine derartige starke Fluoreszenzintensität ändert sich selbst dann nicht in Koexistenz mit anderen Sacchariden, wie beispielsweise Galactose oder Fructose.

Die Emission der starken Fluoreszenz durch die Verbindung (7) der Erfindung in Anwesenheit von Glucose kann wie folgt erläutert werden: Die zwei Boronsäuregruppierungen, wie sie in der Struktur der Formel (7) angeordnet sind, sind geeignet zur kovalenten Bindung mit den vier Hydroxylgruppen (OH-Gruppen) an den 1, 2, 4 und 6 Positionen der Glucose, wodurch ein stabiler 1 : 1-Komplex der Verbindung mit Glucose gebildet wird, indem das Unterdrücken (quenching) durch das Stickstoffatom in sicherer Weise verhindert wird.

Im Gegensatz dazu können andere Saccharide, wie beispielsweise Fructose, möglicherweise eine Bindung eingehen nur mit einer der zwei Boronsäuregruppierungen, in welchem alle nur eine sehr schwache Fluoreszenz beobachtet wird. In der Tat kann keine wesentliche Fluoreszenz beobachtet werden durch Saccharide wie Fructose oder Galactose, in ihren Konzentrationen wie sie in menschlichen Körperfluids auftreten.

Somit kann die erfindungsgemäße Verbindung typifiziert

durch die Formel (8) eine starke Fluoreszenz, insbesondere mit Glucose emittieren, und zwar infolge der speziellen Anordnung des Fluorophors, der zwei Boronsäuregruppierungen und des Stickstoffatoms und daher ist die Verbindung geeignet zur Verwendung bei der Detektion von Glucose. Wenn die Detektion mit einer Lösung durchgeführt wird, kann die Bindung zwischen Glucose und der Fluoreszenzverbindung leicht gespalten werden durch Änderung des pH-Werts der Lösung durch eine geeignete Säure, wodurch die Glucose wiederhergestellt wird.

Im allgemeinen kann die erfindungsgemäße Verbindung hergestellt werden dadurch, daß man einer Phenylboronsäure, bei der die Ortho-Position alkylhalogenisiert ist, gestattet mit einem Reagens zu reagieren, welches aus Alkylaminomethylgruppen oder einer Alkyldiaminomethylgruppe steht, und zwar verbunden mit einem Fluorophor, und zwar ferner in Anwesenheit einer Base und mit einem geeigneten Lösungsmittel.

Durch die Anwendung der vorliegenden Erfindung können Saccharide, wie beispielsweise Glucose, mit sehr stabiler synthetischer Verbindung detektiert werden, und zwar im Gegensatz zu dem konventionellen enzymatischen Verfahren, bei dem ziemlich instabile Enzyme für die Detektion von Glucose verwendet werden müssen. Darüber hinaus kann bei der Durchführung des Sacchariddetectionsverfahrens mit der erfindungsgemäßen Erfindung eine Probe in Takt gemessen werden, d. h. ohne daß sie durch das enzymatische Verfahren zerlegt werden müßte, und daher kann die Probe einer weiteren Messung oder Behandlung unterzogen werden.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindung macht es möglich, ein Saccharid oder Saccharide durch spektroskopische Mittel zu detektieren, und zwar ohne Zersetzung der Saccharide. Die Technologie hat somit gute Aussichten bei der Entwicklung in ein Verfahren, bei dem die Detektion *in situ* erfolgen kann, und zwar im Hinblick auf eine spezielle Region eines Organs im Körper. Beispielsweise kann durch Verwendung einer optischen Faser, deren Spitze mit einer Verbindung der vorliegenden Erfindung überzogen ist, die Information hinsichtlich Saccharid innerhalb des Körpers kontinuierlich überwacht werden, um so zweckmäßige klinische Daten vorzuschreiben.

Weitere Vorteile, Ziele und Einzelheiten der Erfindung ergeben sich aus der Beschreibung von Ausführungsbeispielen anhand der Zeichnung, in der Zeichnung zeigt:

Fig. 1 ein Schema, welches die Synthese einer erfindungsgemäßen Fluoreszenzverbindung veranschaulicht;

Fig. 2 die Fluoreszenzintensitäten der erfindungsgemäßen Verbindung in Anwesenheit von Monosacchariden;

Fig. 3 ein Schema, welches die Synthese einer weiteren Fluoreszenzverbindung der Erfindung darstellt;

Fig. 4 die Fluoreszenzintensitäten der erfindungsgemäßen Verbindung in Anwesenheit von Glucose und anderen Monosacchariden.

Es sei bemerkt, daß in den hier angegebenen chemischen Strukturformeln wie üblich die Kohlenstoffatome und die Stickstoffatome in dem Methyl- oder Methylengruppen weggelassen wurden.

Die Erfindung sei nunmehr zur Erleichterung des Verständnisses anhand der folgenden Beispiele erläutert.

#### Beispiel 1

Die Fluoreszenzverbindung der Formel (6) wird entsprechend dem synthetischen Routen gemäß Fig. 1 hergestellt.

Als erstes wird die Phenylboronsäure, wie folgt hergestellt: Orthobromitoluol wird mit Magnesium (1,1-Äquivalente in Diethylether bei 25°C zur Reaktion gebracht. Das

Grignard-Reagens wird tropfenweise einer Lösung aus Trimethylborat (10 Äquivalente) in Diethylether bei -78°C zugegeben. Die Mischung wird weitere 2 Stunden gerührt und sodann gestattet, daß sie sich auf Raumtemperatur erwärmt und sie wird für weitere 2 Stunden gerührt. Der Diethylether wird durch reduzierten Druck entfernt und der Feststoff wird aus Wasser rekristallisiert. Das Boronsäureprodukt wird in einem Vakuumofen über Nacht getrocknet.

Das Boronsäureanhydrid wird mit NBS (N-Bromsuccinimid) (1,1 Äquivalente) und katalytischem AIBN (Azoisobutylnitril), in Tetrachlorkohlenstoff als Lösungsmittel gemischt. Die Mischung wird rückgeführt oder "refluxed", und zwar unter der Bestrahlung einer 200-Watt-Lampe für 2 Stunden. Die Lösung wird, wenn sie heiß ist, gefiltert und das Lösungsmittel wird entfernt, um das gewünschte Brommethylboronsäureanhydrid zu ergeben.

Das Brommethylboronsäureanhydrid wird mit 9-Methylaminomethylanthracen (2,1 Äquivalente) in Chloroform gemischt und 2 Stunden lang rückgeleitet oder "refluxed". Wenn die Mischung kalt ist, wird sie gefiltert und das Lösungsmittel wird entfernt. Der Feststoff wird dann mit Diethylether gewaschen und aus Ethylacetat rekristallisiert, um das gewünschte Produkt zu ergeben.

Analyse des Produkts: PMR (CDCL<sub>3</sub>); chemische Verschiebung (ppm): 2,2 (3H, s), 3,9 (2H, s); 4,5 (2H, s), 7,4 (4H, m), 8,0 (4H, m), 8,4 (1H, s).

MS (SIMS negativ): Masse plus Glykol minus 2 Wasser und 1 Proton 410.

#### Beispiel 2

Die Verbindung der Formel (6) wird wie in Beispiel 1 hergestellt und hinsichtlich Fluoreszenz gemessen, um die Anwendbarkeit der Verbindung auf die Sacchariddetektion auszuwerten.

Eine wäßrige Lösung der Verbindung ( $1.2 \times 10^{-5}$  M) wurde hergestellt, und zwar enthielt sie Natriumchlorid (0,05 M). Der Lösung wurde ein Saccharid (D-Glucose oder D-Fructose) in einer Konzentration von 0,05 M zugegeben, um das Gesamtvolumen der resultierenden Mischung von 100 ml zu erhalten. Die Messungen wurden ausgeführt unter Veränderung des pH-Wertes von annähernd 12 durch die schrittweise Zugabe von HCl. Die aus der Lösung entnommene Probe wird der Messung des Fluoreszenzspektrums ausgesetzt, nachdem der pH-Wert stabilisiert wurde und wurde sodann der Lösung zurückgeführt, und zwar gefolgt von der Zugabe von HCl zur Einstellung des pH-Werts für die weitere Messung. Die Fluoreszenzspektren wurden auf einem Hitachi-Fluorospektrometer F-4500 gemessen, indem UV für die Anregung verwendet wird. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 gezeigt.

Wie man aus Fig. 2 ersieht, hat die Verbindung (6) eine sehr niedrige Fluoreszenzintensität über den pH-Wertbereich von ungefähr 3 bis zu den höheren pH's, was nahelegt, daß die Fluoreszenz infolge von Anthracen unterdrückt wird. In Anwesenheit von Sacchariden wird jedoch die Fluoreszenz stark erhöht, und zwar über einen breiten pH-Wertbereich von 4 bis 10. Es ist daher zu erkennen, daß die Verbindung (6) für die Detektion von Sacchariden durch Fluoreszenz verwendet werden kann.

#### Beispiel 3

Die Fluoreszenzverbindung der Formel (8) wird hergestellt nach den Synthesewegen gemäß Fig. 3.

Die Orthomethylboronsäure wird bromiert mit NBS, und zwar in Tetrachlorkohlenstoff mit AIBN als Initiator unter Rückflußbedingungen und Beleuchtung über 3 Stunden hin-

weg (Ausbeute 60%) (i). Die sich ergebende Orthobrommethyliboronsäure wird sodann zur Reaktion gebracht mit 2,2-Diemethyl-1,3-propandiol in Toluol mit azeotropischer Entfernung von Wasser über Nacht (Dean Stark) (quantitative Ausbeute) (ii).

Die geschützte oder erhaltene Orthobrommethyliboronsäure wird sodann mit Anthryldiamin und Kaliumcarbonat in THF unter Rückflußbedingungen über Nacht zur Reaktion gebracht (Ausbeute 5% isoliert) (iii). Die schützende Gruppe wird entfernt, und zwar in 33,3% MeOH/H<sub>2</sub>O mit einem pH-Wert 7,7 und Raumtemperatur (iv).

Analyse des Produkts (geschützte Diboronsäure): PMR (CDCL<sub>3</sub>, 300 MHz), chemische Verschiebung (ppm) 8,4 (m, aromatisch, 16H), 4,4 (s, CH<sub>2</sub> (anthrylisch), 4H) 3,3, (s 15 CH, benzylisch) 4H), 3,6 (s, CH<sub>2</sub> (schützende Gruppe), 8H), 2,2 (s, CH<sub>3</sub>N, 6H), 0,9 (s, CH<sub>3</sub> (schützende Gruppe), 12H). MS (SIMS; NPOE) Masse plus 668.

#### Beispiel 4

Die Verbindung der Formel (8), wie sie in Beispiel 3 hergestellt wurde, wird hinsichtlich Fluoreszenz gemessen, und die Anwendbarkeit der Verbindung zur Glucosendetektion auszuwerten.

Die Diboronsäureverbindung (8) wird in einer gepufferten (pH 7,77, 0,01 M KCl, 0,000262 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) wäßrigen Methanolsäurelösung (33% Methanol Wasser) aufgelöst. Portionen oder Teile von Sacchariden wurden in 100 ml der Lösung zugegeben und die Fluoreszenzspektren wurden auf einem Hitachi F-4500 Fluorospektrophotometer gemessen, und zwar zusammen mit einem Hewlett Packard VETRA 286/12 Computer. UV (370 nm) wurde zur Anregung verwendet.

Die Ergebnisse sind in Fig. 4 gezeigt, wobei die Abszisse die logarithmische Molarkonzentration des Saccharids und die Ordinate die relative Fluoreszenzintensität angibt. Wie man aus der Figur erkennt, emittiert die Verbindung (8) der vorliegenden Erfindung eine starke Fluoreszenz insbesondere bei Anwesenheit von Glucose selbst in einer relativ geringen Konzentration. Es sei besonders darauf hingewiesen, daß die Fluoreszenzintensität linear mit der Saccharidkonzentration ansteigt, und zwar im Bereich von 0,0005 M bis 0,001 M entsprechend der Glucosekonzentration, die normalerweise in menschlichen Körperfluids gemessen wird. Dieser Trend gilt nicht nur im Falle des Vorhandenseins von Glucose allein, sondern auch im Falle des Vorhandenseins von Glucose gleichzeitig mit anderen Sacchariden, wie beispielsweise Galactose oder Fructose.

Im Gegensatz dazu entwickelt die Verbindung (8) nahezu keine Fluoreszenz bei Anwesenheit von Ethylenglykol als Kontrollmittel. Bezuglich Galactose oder Fructose zeigt die Verbindung keine substantielle Fluoreszenz selbst bei der maximal möglichen Konzentration eines solchen Saccharids in den Körperfluids (0,0001 M), sondern entwickelt die Fluoreszenz nur dann, wenn die Konzentration dieser Saccharide höher ist um eine oder zwei Größenordnungen. Es ist daher verständlich, daß die Verbindung (8) der vorliegenden Erfindung bei der Detektion von Glucose verwendet werden kann, da sie starke Fluoreszenz, insbesondere in Anwesenheit von Glucose emittiert.

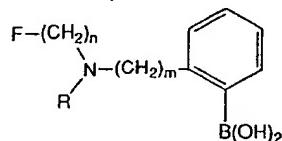
Zusammenfassend sieht die Erfindung folgendes vor: Eine Fluoreszenzverbindung mit einer Molekularstruktur, die ein Fluorophor aufweist, mindestens eine Phenylboronsäuregruppierung und mindestens ein aminvorschendes Stickstoffatom, wobei das Stickstoffatom in der Nähe der Phenylboronsäuregruppierung angeordnet ist, um so in Wechselwirkung zu treten in intermolekularer Hinsicht mit der Boronsäure. Die Verbindung emittiert Fluoreszenz mit

einer hohen Intensität bei der Bindung mit Sacchariden oder einem Saccharid und die Verbindung ist daher geeignet zur Verwendung bei der Detektion eines oder mehrerer Saccharide.

5

## Patentansprüche

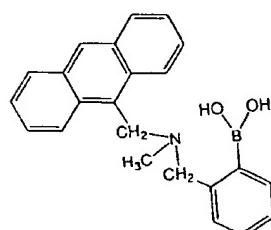
1. Eine Fluoreszenzverbindung mit einer Molekularstruktur, die ein Fluorophor aufweist, mindestens eine Phenylboronsäuregruppierung und mindestens ein aminvorschendes Stickstoffatom, wobei das Stickstoffatom in der Nähe der Phenylboronsäuregruppierung angeordnet ist, um so intermolekular mit der Boronsäure in Wechselwirkung zu treten.
2. Eine Fluoreszenzverbindung mit der folgenden allgemeinen Formel:



20

wobei F ein Fluorophor repräsentiert, R ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus niedrigen aliphatischen und aromatischen Funktionsgruppen besteht, und n und m jeweils 0, 1 oder 2 ist, wobei  $n+m \leq 2$  oder 3 ist.

3. Eine Fluoreszenzverbindung nach Anspruch 2, wobei F ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Naphthyl, Anthryl, Pyrenyl und Phenanthryl.
4. Eine Fluoreszenzverbindung der folgenden Formel:



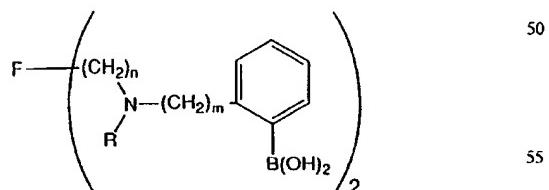
30

35

40

45

5. Eine Fluoreszenzverbindung der folgenden allgemeinen Formel:



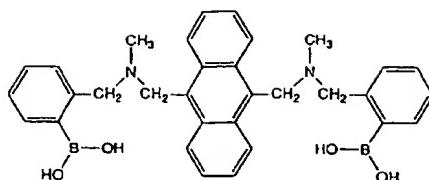
50

55

wobei F ein Fluorophor repräsentiert, R ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus niedrigen aliphatischen und aromatischen Funktionsgruppen und n und m jeweils 0, 1 oder 2 sind und  $n+m \leq 2$  oder 3 sind.

6. Eine Fluoreszenzverbindung nach Anspruch 5, wobei F aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus Naphthyl, Anthryl, Pyrinyl und Phenanthryl.

7. Eine Fluoreszenzverbindung mit der folgenden Formel:

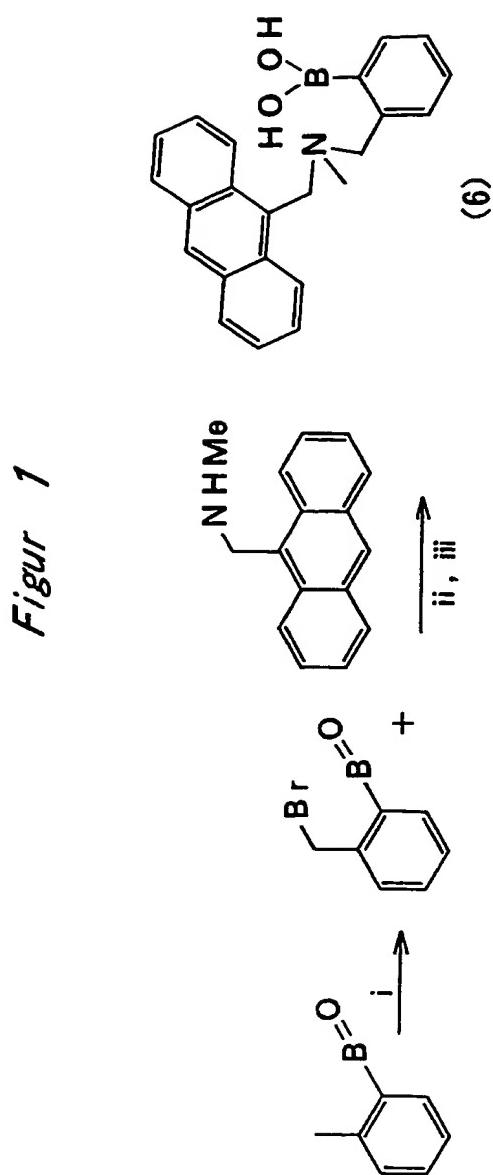


10

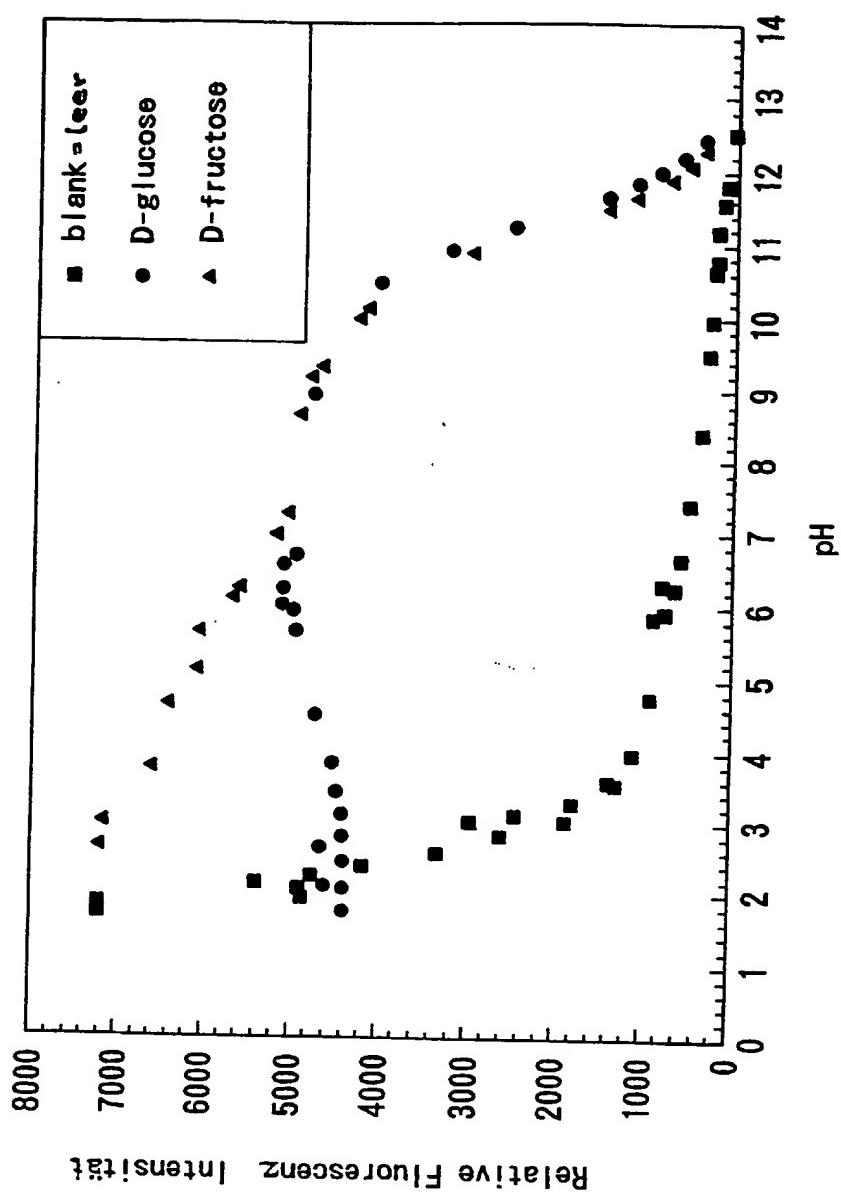
---

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

---



Figur 2



Figur 3

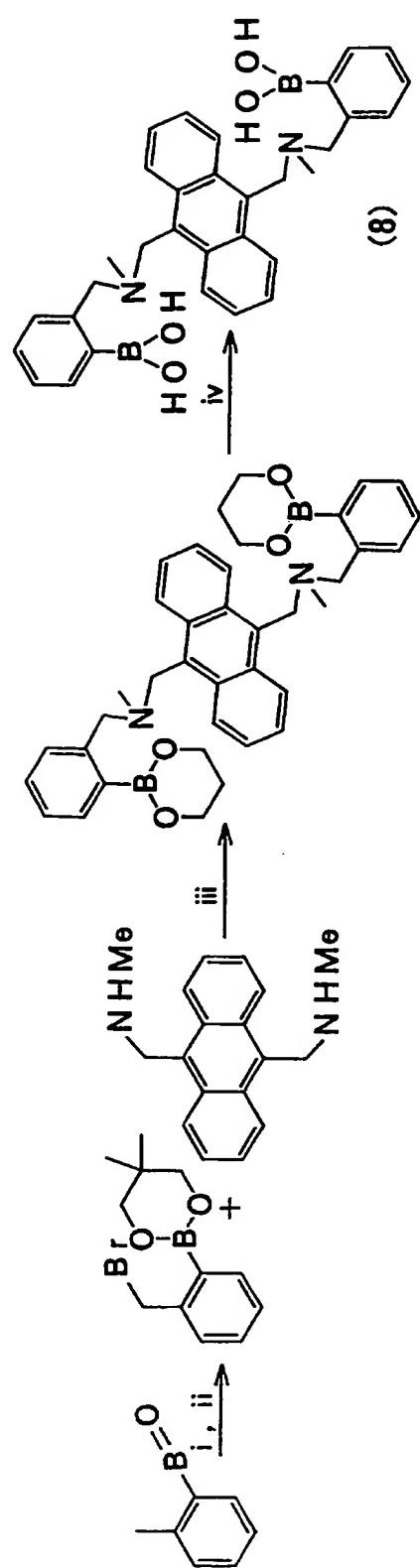


Figure 4

